

BIOTINYLATED LABELED COMPOUND AND METHOD FOR FLUORESCENT LABELING USING THE SAME

Publication number: JP7157487 (A)

Publication date: 1995-06-20

Inventor(s): SUZUKI OSAMU; ICHIHARA TATSUO; MASUDA GEN; TAKEZAKI KAZUHISA +

Applicant(s): NISSHIN SPINNING +

Classification:

- international: **C07D495/04; G01N21/78; G01N33/58; C07D495/00; G01N21/77; G01N33/58; (IPC1-7): C07D495/04; G01N21/78; G01N33/58**

- European:

Application number: JP19930339727 19931206

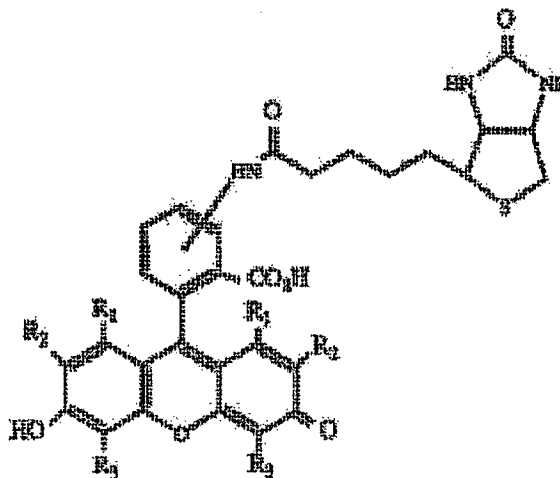
Priority number(s): JP19930339727 19931206

Also published as:

JP3438927 (B2)

Abstract of JP 7157487 (A)

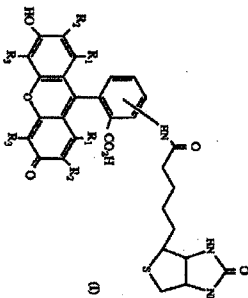
PURPOSE: To obtain a new compound useful for fluorescent label DNA probe method for fluorescent label RNA probe method for analyzing a DNA base sequence. **CONSTITUTION:** A compound of the formula (R1, R2 and R3 are each H, a lower alkyl or a halogen). This compound is obtained by reacting a fluoresceinamine derivative with biotin by a well-known method for forming a peptide bond. The compound of the formula has detection sensitivity more excellent than that of chemical coloring method, is capable of using and storing streptavidin or avidin separately from a biotinylated fluorescent compound, has excellent stability and excellent reproducibility of fluorescent detection. Being simply synthesized, an advantage is inexpensive.; Fluorescent labeling can be carried out by (1) a process for labeling a DNA or an RNA with biotin, (2) a process for reacting the DNA or the RNA labeled by biotin with streptavidin or avidin and (3) a process for reacting the complex obtained by the process (2) with the compound of the formula.



Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

| | | | |
|---|---|---|---------------------------------------|
| (61) Int.Cl. ⁺ C 07 D 465/04 G 01 N 21/78 33/58 | 識別記号 1 0 3 C Z | 庁内整理番号 F 1 | 技術表示箇所 |
| (21) 出願番号 特願平5-339727 | 特願平5-339727 | 審査請求 実請求 | 請求項の数 5 F D (全 7 頁) |
| (22) 出願日 平成5年(1993)12月6日 | (71) 出願人 000004674 日清紡織株式会社 東京都中央区日本橋人形町2丁目31番11号 鈴木 収 東京都足立区西新井栄町1-18-1 日清 紡織株式会社東京研究センター内 市原 竜生 東京都足立区西新井栄町1-18-1 日清 紡織株式会社東京研究センター内 増田 現 東京都足立区西新井栄町1-18-1 日清 紡織株式会社東京研究センター内 井理士 小林 雅人 (外1名) 最終頁に続く | (72) 発明者 鈴木 収 東京都足立区西新井栄町1-18-1 日清 紡織株式会社東京研究センター内 市原 竜生 東京都足立区西新井栄町1-18-1 日清 紡織株式会社東京研究センター内 増田 現 東京都足立区西新井栄町1-18-1 日清 紡織株式会社東京研究センター内 井理士 小林 雅人 (外1名) 最終頁に続く | (74) 代理人 井理士 小林 雅人 (外1名) 最終頁に続く |

(57) 【要約】 (修正有)
【目的】 化学発色検出よりも優れた検出感度を有し、ストレプトアビジン又はアビジンと、ビオチン化蛍光化合物を別々に使用・保存可能であるため、安定性に優れており、使用操作も簡便であり、再現性の高い結果が得られ、合成法も簡便であるため安価に大量調製が可能になるビオチン化糖鎖化合物、及びそれを利用した蛍光標識化方法を提供する。
【構成】 下記式 (1)



特開平7-157487

(2)

【特許請求の範囲】
【請求項1】 式 (1)
【化1】

1

(2)

【化4】

2

【請求項5】 次の工程を含むことを特徴とする蛍光標識化方法： (1) ビオチンによりDNA又はRNAを標識する工程； (2) ビオチンにより標識したDNA又はRNAと、ストレプトアビジン又はアビジンを反応させる工程； (3) (2) で得た複合体と、式 (1)
【化5】

20

【請求項3】 式 (1-1)
【化2】

30

【請求項4】 式 (1)
【請求項4】 式 (1)

40

【請求項3】 式 (1-2)
【化3】

50

【請求項4】 式 (1)

【発明の効用】本発明のビオチン化標識化合物は、簡便に合成できるので安価であり、又、経時的に安定な化合物であるので蛍光検出の再現性は良好で、保存性に優れている。

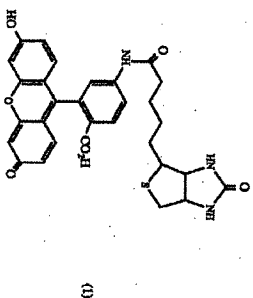
【0024】

【実施例】以下に、実施例をあげて本発明を更に具体的に説明する。

【0025】実施例1

ビオチン0.24g及び5-アミノフルオレセイン0.35gを、乾燥したジメチルホルムアミド16mlに溶解した。2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルクロニウムヘキサフルオロホスファート0.57gの乾燥ジメチルホルムアミド(8ml)溶液を加え、更に、トリエチルアミン0.14mlを加えて、室温で3日間反応させた。反応液に飽和食塩水を加えて析出した結晶を濾別し、濾液を酢酸エチルで抽出し、有機層を乾燥後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(流出溶媒：塩化メチル/メタノール=5/1、次に、クロロホルム/メタノール=2/1)で精製し、以下の式(1)で表わされる目的化合物(以下、化合物(1))のようにも表わす)0.23gを得た(収率40%)。

【化11】



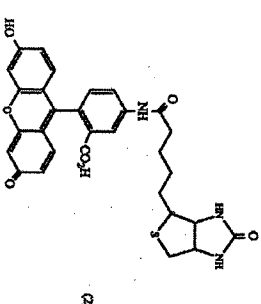
(1)

組織切片に対して、ハバグリダイゼーション(insitu)を行なった。ハバグリダイゼーション、スキムミルクでプロッキングし、ヌトロフアビデジン1μgを添加し、0.1Mトリス塩酸(pH7.5)、0.1M食塩水、0.05% Triton X-100で洗浄した。遮光下、上記合成したビオチン化フルオレセイン(1)を1%含む30%ジメチルホルムアミド-2.5mMトリス緩衝液5μlを添加し、1時間放置した後、50%メタノール、0.1Mトリス緩衝液(pH7.5)で洗浄した。80%グリセロールで組織切片を封入し、蛍光顕微鏡で観察してヌス下腺組織に特異的なシグナルを得た。合成した化合物の溶液を、遮光下室温で30日放置した後、同様な操作でヌス下腺組織に特異的なシグナルを得た。

【0027】実施例2

実施例1において、6-アミノフルオレセインを、5-アミノフルオレセインの代わりに用いて実施し、以下の式(2)で表わされる目的化合物を200mg得た。

【化12】



(2)

【0028】

赤外線吸収ベクトル(KBr, cm⁻¹): 3300, 1689, 1635, 1607, 1593, 1460, 1295, 1272

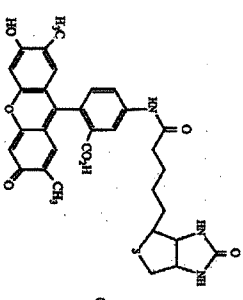
【0028】[核種の検出] ヲナス下腺NGFの特異的抗体をオキヤリ調整し、これにヌトロフアビデジンを結合させた。ヌス下腺生体内から取り出したヌ下腺をサツカロース等で固定後、ヌス下腺(腺)のバラツキ切片を作製し、キシレンによる脱パラフィン、アルコールによる脱水などの組織切片前処理をした。次いで、10%スキムミルクで、組織切片への抗体の非特異的吸着を防

ぐためにプロッキングし、NGF抗体-ヌトロフアビデジンを調製した。逆轉のNGF抗体-ヌトロフアビデジンを洗浄除去し、上記合成した化合物(2)を1%含む、30%ジメチルホルムアミド-2.5mMトリス緩衝液5μlで洗浄し、組織に特異的なシグナルを得た。合成した化合物の溶液を、遮光下室温で30日放置した後、同様な操作でヌス下腺組織に特異的なシグナルを得た。

【0029】実施例3

実施例1において、5'-アミノ-2,7-ジメチルフルオレセインを、5-アミノフルオレセインの代わりに用いて実施し、以下の式(3)で表わされる目的化合物を180mg得た。

【化13】



(3)

【0030】

赤外線吸収ベクトル(KBr, cm⁻¹): 3312, 1690, 1632, 1610, 1590, 1455, 1291

【0030】[核種の検出] ショウジョウバエ(Drosophila melanogaster)の卵を回収し、D. Tautzの方法(Ln Silu Hybridization, D. Tautz et al., 1992, 61-73, IRL Press)によって胚に前処理を行い、アバグリダイゼーションを行った。f12遺伝子を含むベクターよりf12遺伝子断片のみを回収し、これをデンプンプレートにしてランダムライアー法で作製したビオチン標識したDNAアプローブで、上記胚に対してオールバック法でハイブリダイゼーションを行った。洗浄操作後、アビデジン

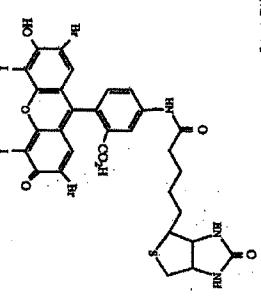
mlを添加し、0.1Mトリス塩酸(pH7.5)、0.1M食塩水で洗浄した。遮光下、0.1Mトリス塩酸(pH7.5)、0.1M食塩水、2mM塩化マグネシウム、0.05% Triton X-100溶液1mlに、上記合成した化合物(3)を1%含む30%ジメチルホルムアミド-2.5mMトリス緩衝液5μlを加えた溶液で標識し、暗所で1時間放置後90%エタノール、70%エタノール、50%エタノール、0.1Mトリス塩酸-0.1M食塩水で洗浄した。蛍光顕微鏡で観察して組織に特異的なシグナルを得た。合成した化合物の溶液を、遮光下室温で30日放置した後、同様な操作でヌス下腺組織に特異的なシグナルを得た。

【0031】実施例4

【0031】実施例4

【0031】において、5'-アミノ-2,7-ジメチルフルオレセインを5-アミノフルオレセインの代わりに用いて実施し、以下の式(4)で表わされる目的化合物を125mg得た。

【化14】



(4)

【0032】

赤外線吸収ベクトル(KBr, cm⁻¹): 3308, 1695, 1640, 1608, 1590, 1465, 1295, 1271

【0032】[核種の検出] ヲナスNGF-cDNAをデンプンプレートにしてランダムライアー法でデオキシゲン標識したDNAアプローブを調整した。ヌス下腺組織切片を、上記DNAでハイブリダイゼーション(insitu)を行なった。ハバグリダイゼーション、スキムミルクでプロッキングし、デオキシゲン抗体-ヌス

融点: 238℃ (分解)

¹H-NMRスベクトル(DMSO-d₆, ppm, δ): 1.35~1.75 (6H, m), 2.39 (2H, t), 2.59 (1H, d), 2.84 (1H, d), 3.16 (1H, m), 4.16 (1H, m), 4.31 (1H, m), 6.37 (1H, s), 6.4 (1H, s), 6.50~6.64 (6H, m), 7.18 (1H, d), 7.81 (1H, d), 8.3 (1H, s), 10.15 (1H, bs), 10.3 (1H, s) 赤外線吸収ベクトル(KBr, cm⁻¹): 3300, 1685, 1636, 1605, 1591, 1459, 1294, 1272

【0026】[核種の検出] ヲナス下腺NGF (神経成長因子) のcDNA (O. 35Kb) をデンプンプレートとして、ランダムライアー法でビオチン標識DNAアプローブを合成した。このアプローブを用い、ヌス下腺

組織切片に対して、ハバグリダイゼーション (insitu) を行なった。ハバグリダイゼーション、スキムミルクでプロッキングし、ヌトロフアビデジン1μgを添加し、0.1Mトリス塩酸 (pH7.5)、0.1M食塩水、0.05% Triton X-100で洗浄した。遮光下、上記合成したビオチン化フルオレセイン (1) を1%含む30%ジメチルホルムアミド-2.5mMトリス緩衝液5μlを添加し、1時間放置した後、50%メタノール、0.1Mトリス緩衝液 (pH7.5) で洗浄した。80%グリセロールで組織切片を封入し、蛍光顕微鏡で観察してヌス下腺組織に特異的なシグナルを得た。合成した化合物の溶液を、遮光下室温で30日放置した後、同様な操作でヌス下腺組織に特異的なシグナルを得た。

【0027】実施例2

実施例1において、6-アミノフルオレセインを、5-アミノフルオレセインの代わりに用いて実施し、以下の式 (2) で表わされる目的化合物を200mg得た。

【化12】

赤外線吸収ベクトル (KBr, cm⁻¹): 3300, 1689, 1635, 1607, 1593, 1460, 1295, 1272

【0028】[核種の検出] ヲナス下腺NGFの特異的抗体をオキヤリ調整し、これにヌトロフアビデジンを結合させた。ヌス下腺生体内から取り出したヌ下腺をサツカロース等で固定後、ヌス下腺 (腺) のバラツキ切片を作製し、キシレンによる脱パラフィン、アルコールによる脱水などの組織切片前処理をした。次いで、10%スキムミルクで、組織切片への抗体の非特異的吸着を防

ぐためにプロッキングし、NGF抗体-ヌトロフアビデジンを調製した。逆轉のNGF抗体-ヌトロフアビデジンを洗浄除去し、上記合成した化合物 (2) を1%含む、30%ジメチルホルムアミド-2.5mMトリス緩衝液5μlで洗浄し、組織に特異的なシグナルを得た。合成した化合物の溶液を、遮光下室温で30日放置した後、同様な操作でヌス下腺組織に特異的なシグナルを得た。

【0029】実施例3

実施例1において、5'-アミノ-2,7-ジメチルフルオレセインを、5-アミノフルオレセインの代わりに用いて実施し、以下の式 (3) で表わされる目的化合物を180mg得た。

【化13】

赤外線吸収ベクトル (KBr, cm⁻¹): 3312, 1690, 1632, 1610, 1590, 1455, 1291

【0030】[核種の検出] ショウジョウバエ (Drosophila melanogaster) の卵を回収し、D. Tautzの方法 (Ln Silu Hybridization, D. Tautz et al., 1992, 61-73, IRL Press) によって胚に前処理を行い、アバグリダイゼーションを行った。f12遺伝子を含むベクターよりf12遺伝子断片のみを回収し、これをデンプンプレートにしてランダムライアー法で作製したビオチン標識したDNAアプローブで、上記胚に対してオールバック法でハイブリダイゼーションを行った。洗浄操作後、アビデジン

mlを添加し、0.1Mトリス塩酸 (pH7.5)、0.1M食塩水で洗浄した。遮光下、0.1Mトリス塩酸 (pH7.5)、0.1M食塩水、2mM塩化マグネシウム、0.05% Triton X-100溶液1mlに、上記合成した化合物 (3) を1%含む30%ジメチルホルムアミド-2.5mMトリス緩衝液5μlを加えた溶液で標識し、暗所で1時間放置後90%エタノール、70%エタノール、50%エタノール、0.1Mトリス塩酸-0.1M食塩水で洗浄した。蛍光顕微鏡で観察して組織に特異的なシグナルを得た。合成した化合物の溶液を、遮光下室温で30日放置した後、同様な操作でヌス下腺組織に特異的なシグナルを得た。

【0031】実施例4

【0031】において、5'-アミノ-2,7-ジメチルフルオレセインを5-アミノフルオレセインの代わりに用いて実施し、以下の式 (4) で表わされる目的化合物を125mg得た。

【化14】

赤外線吸収ベクトル (KBr, cm⁻¹): 3308, 1695, 1640, 1608, 1590, 1465, 1295, 1271

【0032】[核種の検出] ヲナスNGF-cDNAをデンプンプレートにしてランダムライアー法でデオキシゲン標識したDNAアプローブを調整した。ヌス下腺組織切片を、上記DNAでハイブリダイゼーション (insitu) を行なった。ハバグリダイゼーション、スキムミルクでプロッキングし、デオキシゲン抗体-ヌス

(7) 特開平7-157487

11

12

シフトアゼジンで標識した。0.1Mトリス塩酸-0.1M食塩で透析し、上記合成した化合物(4)1%を含む、30%ジメチルホルムアミド-25mMリン酸ナトリウム緩衝液5μlで標識し、組織に特異的なシグナル*を得た。合成した化合物の溶液を、遮光下室温で30日放置した後、同様な操作でマウス腎下腺組織に特異的なシグナルを同様に得た。

フロントページの続き

(72)発明者 竹崎 和久

東京都足立区西新井栄町1-18-1 日清紡績株式会社東京研究センター内